

腺苷脱氨酶 (Adenosine deaminase, ADA)活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-ADA001 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

腺苷脱氨酶 (ADA, EC 3.5.4.4) 是一种巯基酶, 是嘌呤核苷酸代谢的关键酶, 与机体细胞的免疫活性有重要关系。

腺苷脱氨酶 (ADA) 催化腺嘌呤核苷水解, 产生次黄嘌呤核苷和氨, 利用氨在强碱的环境下与次氯酸盐和苯酚作用, 生成水溶性染料靛酚蓝, 溶液颜色稳定。其在 630nm 处有特征吸收峰, 通过检测氨增加的速率, 即可计算该酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 2 瓶	-20℃避光保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 每瓶再加 11mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 12mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂五	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	A: 液体 3.5mL×4 瓶 B: 液体 1 支	4℃避光保存	每瓶: 1. 临用前取 30 μL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后作为试剂六使用; 2. 混匀后的试剂六一周内用完。
标准管	液体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

1、样本提取:

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织(水分足的样本可取 0.2-0.5g), 加入 1mL 提取液; 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 也可以按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取。

② 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 630nm。

② 所有试剂解冻至室温(25℃), 在 EP 管依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	100	100
试剂二	100	
试剂三		100
混匀, 放入 37℃ 水浴锅或恒温培养箱中孵育 30min		
试剂三	100	
试剂二		100
混匀, 室温 12000rpm 离心 5min, 上清液待测。		

③ 显色反应: 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
上清液 (上步反应)	30	30
蒸馏水	30	30
试剂四	60	60
试剂五	30	30
试剂六	60	60
充分混匀, 37℃ 放置 20min 后, 于 630nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

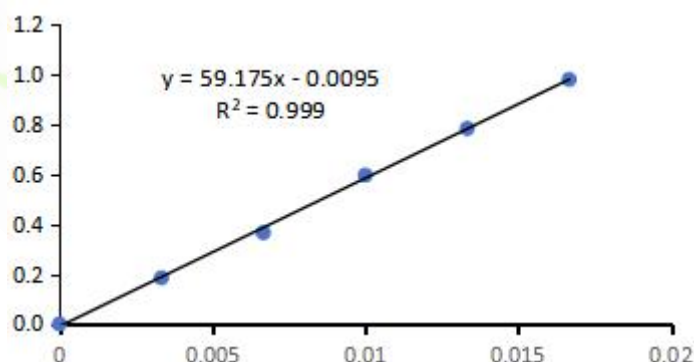
【注】1. 试剂四和五和六需分开加, 不能事先混匀。

2. 若 ΔA 的值较小, 可增加 37℃ 孵育时间 (如增至 1 小时或更长), 或在显色阶段增加上清液量 V_1 (如增至 60μL, 则蒸馏水体积相应减少); 则改变后的 T 和 V_1 需代入计算公式重新计算。

3. 若 A 测定大于 1.5, 可减少 37℃ 孵育时间 (如减至 10min 或更短), 或在显色阶段减少上清液量 V_1 (如减至 15μL, 则蒸馏水体积相应增加); 则改变后的 T 和 V_1 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程为 $y = 59.175x - 0.0095$; x 为标准品摩尔质量 (μmol), y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克蛋白质每小时催化腺苷生成 1μmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ADA}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0095) \div 59.175 \times (V_2 \div V_3) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 9.58 \times (\Delta A + 0.0095) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每小时催化腺苷生成 1μmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ADA}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0095) \div 59.175 \times (V_2 \div V_3) \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 9.58 \times (\Delta A + 0.0095) \div W \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算:

单位定义: 每毫升液体每小时催化腺苷生成 1μmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$ADA (\mu\text{mol/h/mL}) = (\Delta A + 0.0095) \div 59.175 \times (V_2 \div V_3) \div V_1 \div T = 9.58 \times (\Delta A + 0.0095) \div W$$

V---提取液体积, 1mL;

V1---加入②步反应体系中样本体积, 0.04mL;

V2---②步反应体系总体积: 0.34mL;

V3---③步显色步骤中上清液体积, 0.03mL;

T---反应时间, 0.5h;

W---样本质量;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

1 标准品母液为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的氨 (分子量是 18)。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 2, 4, 6, 8, 10. $\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下:

标品浓度 $\mu\text{g/mL}$	0	2	4	6	8	10
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	30	
蒸馏水	30	60
试剂四	60	60
试剂五	30	30
试剂六	60	60
充分混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20min 后, 于 630nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		